

554158

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

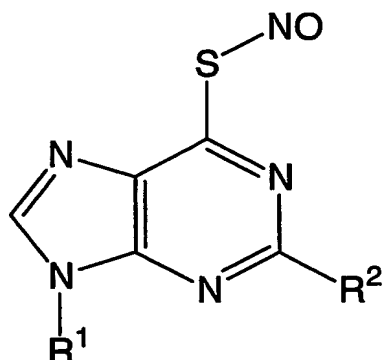
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/094447 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 19/173, 19/073, 21/04, C12N 15/19, 15/11
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003337
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 12 日 (12.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-117569 2003 年 4 月 22 日 (22.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社産学連携機構九州 (KYUSHU TLO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒8120053 福岡県福岡市東区箱崎 6 丁目 10 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 茂貴 (SASAKI, Shigeki) [JP/JP]; 〒8113113 福岡県古賀市千鳥 1-4-8-1012 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: THIONUCLEOSIDE S-NITROSYL DERIVATIVE

(54) 発明の名称: チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体

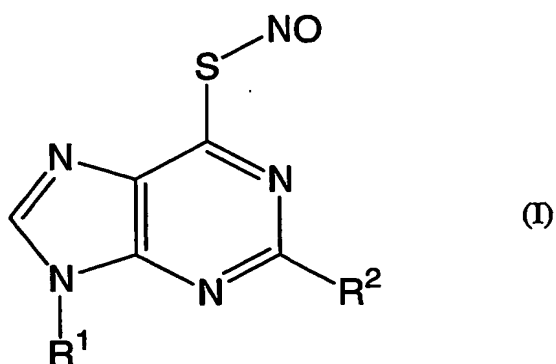


(I)

(57) Abstract: A thionucleoside S-nitrosyl derivative represented by the following formula (I): [wherein R<sup>1</sup> represents ribose, 2-deoxyribose, or a derivative of either; and R<sup>2</sup> represents hydrogen, amino, hydroxy, halogeno, R<sup>3</sup>-oxy, or R<sup>3</sup>-amino (R<sup>3</sup> represents optionally substituted C<sub>1-15</sub> alkyl or optionally substituted C<sub>1-15</sub> acyl)] or a salt of the derivative.

## (57) 要約:

本発明は、次式 I :



〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>-アミノ基（R<sup>3</sup>は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩を提供する。

## 明 細 書

## チオヌクレオシド－S－ニトロシル誘導体

## 5 技術分野

本発明は、核酸を操作する技術の分野に属し、特に、特定の塩基を認識して配列特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸を得るのに有用な新規化合物であるチオヌクレオシド－S－ニトロシル誘導体に関する。

## 10 背景技術

特定の遺伝子の核酸に対して、その核酸配列に特異的なオリゴ核酸あるいは核酸類似体の特異的に結合させ、化学結合を形成し、遺伝子発現を制御する方法が知られている（「ゲノムケミストリー」、関根/斉藤編、講談社、2003年、東京など）。特に最近、化学結合の構造によっては結合部位において点変異を誘起できることが示された（例えば、Nagatsugi, F., Sasaki, S., Miller, P. S., Seidman, M. M., Nucl. Acid Res, Vol. 31(6), e31(2003)など）。このように配列特異的に点変異を誘起する方法は、生化学的な実験ツールとして利用されるばかりでなく、遺伝子の異常を含む様々な病気の根本的な治療に応用できる可能性があることから、生化学および医学・薬学の分野において大きな関心が持たれている。

20 一方、一酸化窒素(NO)は細胞内情報伝達物質として重要な働きをもっている（例えば、L. J. Ignarro, Pharmacology & Toxicology, 67(1), 1, (1990)など）。また生体内では S-ニトロソチオールが一酸化窒素(NO)運搬体として作用していると考えられている（例えば、D. L. H. Williams, Acc. Chem. Res., 32, 869(1999)など）。一酸化窒素(NO)は、情報伝達の役割以外に生体内で酸化剤として作用し、  
25 DNA 又は RNA 中の塩基と反応し、点変異の原因となることがあると考えられている。そして、化学的な実験では、非特異的に変異が誘起されることが示されている（例えば、J. L. Caulfield, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, J. Biol. Chem. 273(21), 12689 (1998) ; N. Y. Tretyakova, S. Burney, B. Pamir, J. S. Wishnok,

P. C. Dedon, G. N. Wogan, S. R. Tannenbaum, *Mutation Research* 447(2), 287 (2000)など)。

最近、修飾オリゴヌクレオチドを用いてミスマッチを含む2重挿入部分を作製し、DNA鎖交換によるDNA修復方法が報告された(M. D. Drury, E. B. Kmiec, *Nucleic Acids Research* 31(3), 899 (2003))。しかしながら、この方法は、モデル実験系ではあるが修復効率が低く、また細胞系への展開に関しても多くの解決すべき課題を持っている。

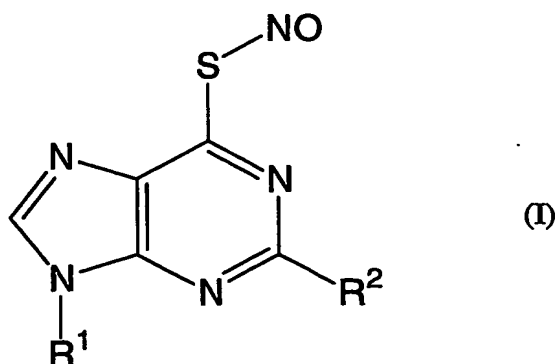
#### 発明の開示

10 本発明は、チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体、標的核酸に特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸及び配列特異的変異誘発方法を提供することを目的とする。

本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、天然の核酸塩基の基本構造のカルボニル基をチオカルボニル基に変換した構造を組み込んだオリゴヌクレオチドを利用し、ニトロシル化を行うことによって新規なニトロシル化合物を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功した。さらに、このオリゴヌクレオチドが配列特異的にかつ塩基特異的に、ニトロシル基を転移させることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

20 (1) 次式(I)：

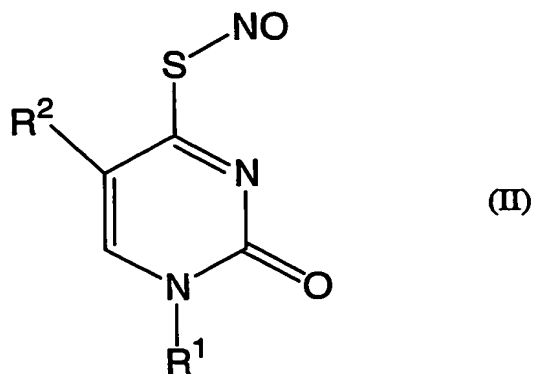


〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>〕

ーアミノ基 ( $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。)を表す。]

で示されるチオヌクレオシドーS-ニトロシル誘導体又はその塩。

(2) 次式 (I·I) :

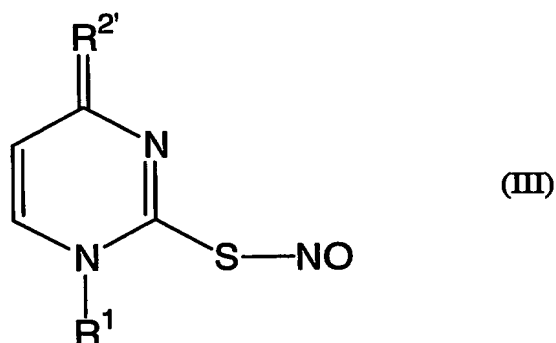


5

[式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基 ( $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。)を表す。]

10 で示されるチオヌクレオシドーS-ニトロシル誘導体又はその塩。

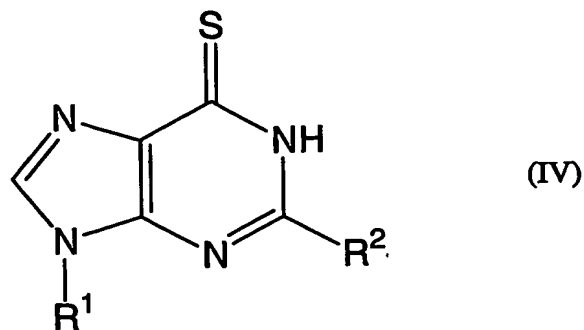
(3) 次式 (I I I) :



( $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^{2'}$ は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

15 で示されるチオヌクレオシドーS-ニトロシル誘導体又はその塩。

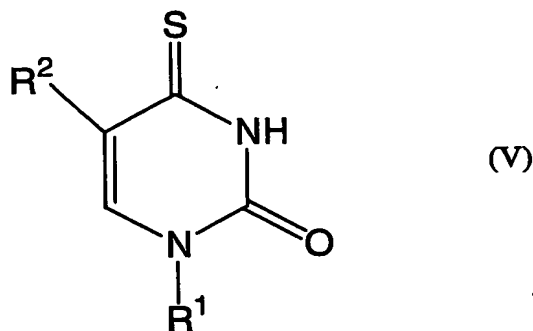
(4) 次式 (I V) :



〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>-アミノ基（R<sup>3</sup>は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドとS-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

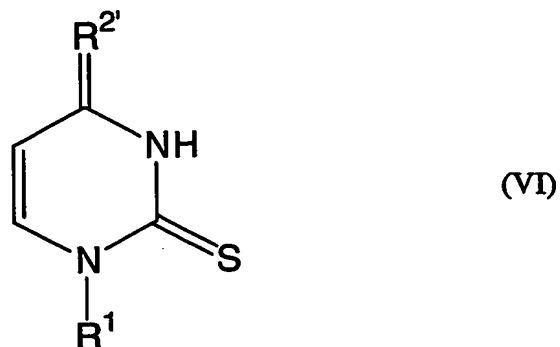
(5) 次式 (V) :



〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>-アミノ基（R<sup>3</sup>は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドとS-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

(6) 次式 (VI) :



〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。〕

- 5   で示されるチオヌクレオシドとS-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

(7) 前記(1)～(3)のいずれか1項に記載の誘導体又はその塩を含むオリゴ核酸。

本発明のオリゴ核酸としては、例えば少なくとも12塩基の長さを有するものが挙げられる。

- 10   (8) 前記(7)記載のオリゴ核酸と該オリゴ核酸に対する相補鎖とを反応させることにより、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその対応塩基に転移させることを特徴とするニトロシル基の転移方法。

(9) 前記(7)記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させ、得られる反応産物を酸性条件下で処理することを特徴とする塩基配列の変異誘発方法。

- 15   本発明の変異誘発方法によれば、オリゴ核酸とその相補鎖との反応産物において、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその相補鎖側の対応塩基に転移させることにより、当該対応塩基をウラシルに変異させることができる。

- 20   (10) 前記(1)～(3)のいずれか1項に記載の誘導体並びに前記(7)記載のオリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む、塩基配列の変異誘発剤又は塩基配列の変異誘発用キット。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の誘導体によるニトロシル基の転移を示す図である。

図 2 は、N-ニトロソ体のカルボニル基への加水分解反応を示す図である。

図 3 は、本発明のヌクレオシド誘導体の合成工程を示す図である。

図 4 は、本発明のヌクレオシド誘導体の HPLC の結果を示す図である。

図 5 は、本発明のニトロシル化オリゴ核酸の合成工程を示す図である。

5 図 6 は、ニトロシル化オリゴ核酸生成の HPLC の結果を示す図である。

図 7 は、ニトロシル化オリゴ核酸 DAF-2 の蛍光強度の増大曲線を示す図である。

図 8 は、オリゴヌクレオチドとその相補鎖の配列およびそれらの反応を示す図である。

10 図 9 は、NO-転移反応を行った HPLC の結果を示す図である。

図 10 は、オリゴヌクレオチド 7 を用いて NO-転移反応を行った経時変化を示す図である。

図 11 は、オリゴヌクレオチド 7 とオリゴヌクレオチド 9 との DAF-2 との反応生成物を分析し、NO の存在を確認した HPLC 図である。

15 図 12 は、オリゴヌクレオチド 8 に NO-転移が起こり生成した 9 の酵素分解物を HPLC 分析することによりシチジンがデオキシウリジンおよびシチジンジアゾエート体に変異したことを示す図である。

図 13 は、オリゴヌクレオチド 8 に NO-転移が起こり生成した 9 の酵素分解物を HPLC 分析することにより 5-メチルシチジンがチミジンおよび 5-メチルシチジンジアゾエート体に変異したことを示す図である。

20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

25 本発明の誘導体は、チオヌクレオシドの硫黄原子上にニトロシル基が結合した構造を有することを特徴とする。また、本発明の誘導体は、特定の塩基を認識しこれに結合することにより、自己が持つニトロシル基を相手の塩基に転移させることを特徴とするものである。



## 1. チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体

上記の一般式 (I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物 (チオヌクレオチド-S-ニトロシル誘導体) において、 $R^1$  はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表す。 $R^2$  は、水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基、 $R^3$ -アミノ基を表す。 $R^{2'}$  は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。

ここで $R^3$  は、置換されてもよい炭素数 1~15 のアルキル基又は置換されてもよい炭素数 1~15 のアシル基を表す。但し、アルキル基又はアシル基の炭素数は、好ましくは 1~10 であり、さらに好ましくは 1~5 である。

10 アルキル基としては、直鎖、分枝鎖又は環状のいずれでもよく、例えばメチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、イソプロピル基、 $n$ -ブチル基、 $t$ -ブチル基、 $n$ -ペンチル基、 $n$ -ヘキシル基、シクロヘキシル基、 $n$ -ヘプチル基、 $n$ -オクタチル基、 $n$ -ドデシル基等が挙げられる。

炭素数 1~15 のアシル基とは、直鎖状又は分岐して、置換されてもよいアルキルアシル基、置換されてもよいシクロアルキルカルボニル基、又は置換されてもよいベンゾイル基等を表す。

例えば、アルキルアシル基としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、 $n$ -ブチリル基、イソブチリル基、2-メチルブチリル基、3-メチルブチリル基、ピバロイル基、バレリル基、2-メチルバレリル基、カプロイル基、ヘ  
20 プタノイル基、オクタノイル基、デカノイル基等が挙げられる。

また、シクロアルキルカルボニル基としては、シクロプロパンカルボニル基、シクロヘキサンカルボニル基、シクロペンタンカルボニル基等が挙げられる。

置換されてもよいベンゾイル基において、フェニル基上の置換基は無置換でもよく、フェニル基上の 2 位、3 位、4 位のいずれかの位置が置換されてもよい。

25 また、複数の位置に置換基があってもよく、その場合の置換基は同一であってもそれぞれ異なるものでもよい。

フェニル基上の置換基としては、例えばアルキル基 (メチル基、エチル基、イソプロピル基等); アルキルオキシ基 (メトキシ基、エトキシ基、 $n$ -プロピルオ

キシ基等)；置換又は無置換アミノ基（ニトロ基、アミノ基、メチルアミノ基、エチルアミノ基、*n*-プロピルアミノ基、*i*-プロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等)；ハロゲン基（フルオロ基、クロロ基、プロモ基等)；アシル基（ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基等)；アシル

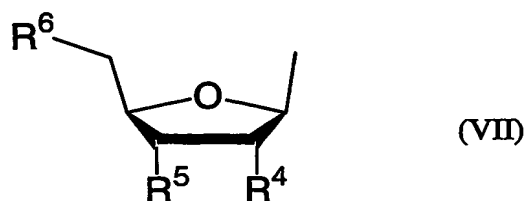
5 オキシ基（ホルミルオキシ基、アセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基、ベンゾイルオキシ基等)；アミド基（ホルムアミド基、アセトアミド基、ベンズアミド基等)；芳香環（フェニル基等）などが挙げられる。

置換されてもよいベンゾイル基としては、具体的にはベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、2-

10 -メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、3, 5-ジニトロベンゾイル基、2-アミノベンゾイル基、3-アミノベンゾイル基、4-アミノベンゾイル基、4-ジメチルアミノベンゾイル基、2-クロロベンゾ

15 イル基、3-クロロベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基、2-プロモベンゾイル基、3-プロモベンゾイル基、4-プロモベンゾイル基、3, 5-ジクロロベンゾイル基、2, 4-ジクロロベンゾイル基、パークロロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基等が挙げられる。

リボース又はデオキシリボースは、次式(VII)：



20 で示されるものである。ここで、式(VII)において、 $R^4$ は、水酸基（リボースの場合）又は水素原子（デオキシリボースの場合）を表す。 $R^5$ 及び $R^6$ は、リボース及びデオキシリボース並びにこれらの誘導体のいずれの場合であっても、互いに独立し、同一又は異なって、例えば水素原子、ハロゲン基、置換されてもよい水酸基を表す。

25  $R^5$ 及び/又は $R^6$ においてハロゲン基とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又

はヨウ素原子を表す。また、 $R^4$ 及び/又は $R^5$ において置換された水酸基としては、一般的な水酸基の保護基となりうる置換基により置換された水酸基（例えばカルボン酸エステル、スルホン酸エステル、エーテル、ウレタン、シリル基等）を表す。

- 5 水酸基の保護基としては、アルキル基（メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、2-メトキシベンジル基、3-メトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基、2-メチルベンジル基、3-メチルベンジル基、4-メチルベンジル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジル
- 10 オキシエチル基、アセトキシメチル基、アセトキシエチル基、ベンゾイルオキシメチル基、ベンゾイルオキシエチル基等）；アリール基（フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-フェニルフェニル基、2-ピリジニル基、3-ピリジニル基、4-ピリジニル基等）；アシル基（ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、2-
- 15 メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基等）；ウレタン基（アミノカルボニル基、ジメチルアミノカルボニル基、メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基、ジエチル
- 20 アミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基等）；スルホン酸エステル基（メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、2-メチルベンゼンスルホニル基、3-メチルベンゼンスルホニル基、4-メチルベンゼンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基、トリクロロメタンスルホニル基等）；シリル基（トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチル
- 25 シリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基等）が挙げられる。

本発明の式(I)に示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの 3',5'-ビス-*t*-ブチルジメチルシリル

誘導体であり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。

本発明の式(II)に示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの 3',5'-ビス- $\alpha$ -ブチルジメチルシリル

5 誘導体であり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。

本発明の式(III)に示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^{2'}$ が酸素原子又はイミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの 3',5'-ビス- $\alpha$ -ブチルジメチルシリル誘導体であり、かつ、 $R^{2'}$ が酸素原子又はイミノ基のものが挙げ

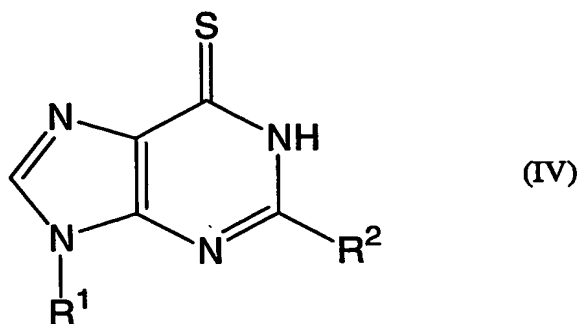
10 られる。

## 2. 本発明の化合物の製造

一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物は、既知の反応を工夫することにより合成することができる。

### 15 (1) 式(I)で示される化合物の製造

本発明において、式(I)で示される化合物を製造する場合は、次式 (IV)：



( $R^1$ 及び $R^2$ は前記と同様である。)で示されるチオヌクレオシド化合物とニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

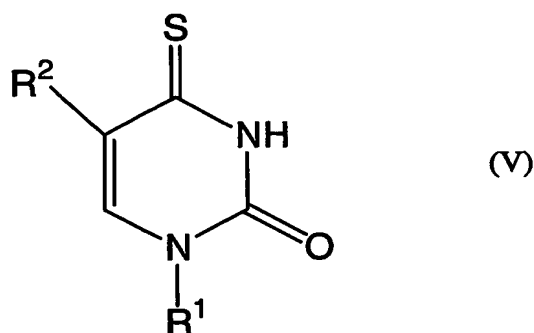
20 すなわち、(IV)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液 (pH 10) に溶解し、約 0.5 mM 濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬 (約 1 mM) を加え室温で 1 2 時間反応させる。反応液を HPLC (ODS カラム、溶媒:0.1 M 酢酸トリエチルアミン-アセトニトリル:10%から 30%、リニアグラジエント、254

nm で検出)で精製し、目的の S-ニトロシル体を得る。(IV)に示す化合物が難水溶性の場合は、有機溶媒（例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど）に溶解し、トリエチルアミンを原料の 10 倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えば S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液(pH 3)に溶解し、約 10 倍当量用いて行う。

## (2) 式 (II)で示される化合物の製造

また、式 (II) で示される化合物を製造する場合は、次式 (V)：



(R¹及びR²は前記と同様である。)

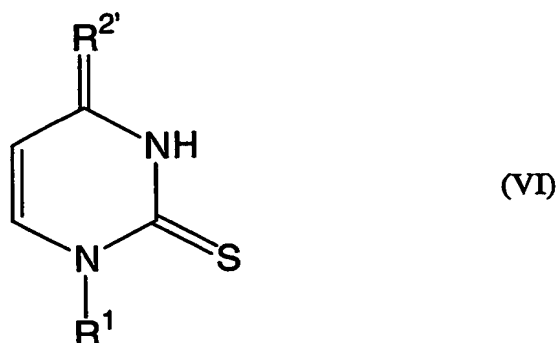
で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

すなわち、(V)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液 (pH 10) に溶解し、約 0.5 mM 濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬 (約 1 mM) を加え室温で 12 時間反応させる。反応液を HPLC (ODS カラム、溶媒：0.1 M 酢酸トリエチルアミン・アセトニトリル：10%から 30%、リニアグラジエント、254 nm で検出)で精製し、目的の S-ニトロシル体を得る。(IV)に示す化合物が難水溶性の場合は、有機溶媒（例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど）に溶解し、トリエチルアミンを原料の 10 倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えば S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液(pH 3)に溶解し、約10倍当量用いて行う。

### (3) 式 (III)で示される化合物の製造

5 式 (III)で示される化合物を製造する場合は、次式 (VI) :



(R¹及びR²は前記と同様である。)

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

- 10 すなわち、(VI)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液 (pH 10) に溶解し、約 0.5 mM 濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬 (約 1 mM) を加え室温で 12 時間反応させる。反応液を HPLC (ODS カラム、溶媒: 0.1 M 酢酸トリエチルアミン・アセトニトリル: 10% から 30%、リニアグラジエント、254 nm で検出) で精製し、目的の S-ニトロシル体を得る。(IV) に示す化合物が難水
- 15 溶性の場合は、有機溶媒 (例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど) に溶解し、トリエチルアミンを原料の 10 倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えば S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

20 亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液(pH 3)に溶解し、約10倍当量用いて行う。

### (4) 本発明の化合物の塩

上記一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物は、酸付加塩又は塩基

付加塩を形成する場合があるが、このような塩も本発明の範囲に包含される。本発明の化合物を生体に適用可能なオリゴ核酸及びその製造中間体として用いる場合には、塩としては生理的に許容されるものが好ましい。塩基付加塩としては、例えば、トリエチルアミン、ジメチルアミン、アンモニア、ジエチルアミン等のアミン類の塩、又はナトリウム、カリウム、カルシウム若しくはマグネシウム等の金属類の塩を挙げることができる。酸付加物として例えば、塩酸、硫酸、若しくは過塩素酸等の鉱酸類の塩；又はシュウ酸、フマル酸、マレイン酸、酢酸、プロピオン酸、メタンスルホン酸若しくは p-トルエンスルホン酸等の有機酸等との塩を挙げることができる。

10

### 3. オリゴ核酸

一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物はヌクレオシドであるため、これにリン酸をエステル結合させるとヌクレオチドとなり、核酸の構成成分となる。

15

このようにして得られたヌクレオチドは、適当なオリゴ核酸に組み入れて、配列特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸として使用することができる。

「ニトロシル基を転移する」とは、本発明のオリゴ核酸中のニトロシル基（本発明の化合物中に存在するニトロシル基）を、当該オリゴ核酸と反応する相手側の核酸中の塩基であって2本鎖（錯体）を形成している当該相手側の塩基（標的塩基ともいう）に転移することを意味する（図1）。

20

本発明のオリゴ核酸の配列は、特に限定されるものではなく、鋳型となる核酸配列に応じて設計することも、ランダムな塩基配列となるように設計することもできる。ある遺伝子の塩基配列にニトロシル基を転移させようとする場合は、当該遺伝子の標的塩基配列に相補的となるようにオリゴ核酸を設計することができる（この場合、本発明のオリゴ核酸側から見れば、当該遺伝子の塩基配列がオリゴ核酸の相補鎖となる）。本発明のオリゴ核酸をランダムな塩基配列となるように設計した場合は、そのいずれかの塩基にニトロシル基が導入されている。従ってこれらのニトロシル基を転移させるように、上記ランダムな塩基配列に相補的な

25

配列を有する核酸を合成することができる（この場合、本発明のオリゴ核酸側から見れば、その合成された核酸がオリゴ核酸の相補鎖となる）。

本発明のオリゴ核酸配列の長さは、その標的塩基に本発明の化合物中のニトロシル基を転移することができる限り特に限定されるものではない。本発明において、少なくとも 12 塩基を有していることが好ましく、15～22 塩基であることがより好ましい。本発明の化合物をオリゴ核酸中に組み入れる位置は、任意の位置でよいが、特に配列特異性を発現させる場合には、本発明の化合物が、好ましくはオリゴ核酸の両末端から 3 番目より内側に位置するように組み入れるとよい。例えば、図 5 において、本発明のオリゴ核酸 7 は 16 塩基を有しており、そのうち本発明の化合物は 5 番目に位置している。さらに、本発明のオリゴ核酸中に含まれる本発明の化合物は、1 箇所である必要はなく、複数箇所であってもよい。すなわち、本発明のオリゴ核酸において、ニトロシル基を導入する標的塩基の数は特に限定されるものではない。そして、誘導体の存在位置が複数箇所の場合は、2 箇所以上連続してもよく、不連続でもよい。

オリゴ核酸の製造は、既知の方法、市販の核酸合成用試薬及び核酸合成装置より合成することができる。以下に式(IV)[ $R^1$  が 2-デオキシリボースのもの]を用いた合成例について記す。式(IV)の 5'-O-p-ジメトキシトリチル-3'-O-( $\beta$ -シアノエチル-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト)体 (約 80 mmol) を無水アセトニトリルに溶解し、DNA 自動合成装置 (Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer) に装着する。合成装置内蔵の標準プログラムによって、1  $\mu$ mol カラムを用いて合成し、合成終了後、28%アンモニア水中にて固相カラムから切り出し、55℃にて 5 時間加温して塩基の脱保護を行い、ODS カラムを接続した HPLC にて精製する (ODS カラム、アセトニトリル-0.1 M TEAA=10%-40% リニアグラジェント/20 分)。さらに、ポーラスカラムで p-ジメトキシトリチル基の脱保護および精製を行う (50 mM 酢酸アンモニア, pH10  $\rightarrow$  5 %アセトニトリル-50 mM 酢酸アンモニア $\rightarrow$ 2%トリフルオロ酢酸 $\rightarrow$ 50 mM 酢酸アンモニア $\rightarrow$ 65%メタノール)。純度検定および構造確認は、例えば MALDI-TOF MS (Perseptive Biosystems, Voyager Elite, 3-hydroxy-2-picolinic



acid-diammonium hydrogen citrate matrix)による分子量測定によって行うことができる。

#### 4. ニトロシル基の転移反応

- 5 一般式 (I)、(II) 又は (III) で示される化合物がニトロシル基を転移する機構は、図 1 に示すように相補的な水素結合で形成される錯体構造中で実現される。なお、このような機能を損なわない限り、一般式 (I)、(II) 又は (III) において複素環に結合している  $R^2$  には、水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基、 $R^3$ -アミノ基、あるいはその他のヘテロ原子 ( $R^3$  は前
- 10 記と同様である)を導入することも可能である。

- 反応条件は、例えば、一般式 (I) で示される化合物を組み込んだ核酸 (約 2.5  $\mu$ M) と相補的な配列の DNA (約 2.5  $\mu$ M) を 0.05 M MES, 0.1 M NaCl を含む緩衝液 (pH 7) に溶解し、室温で反応させる。反応の進行は HPLC (ODS カラム、アセトニトリル-0.1 M TEAA=10%-40% リニアグラジュエント/20 分) で追跡す
- 15 ることができる。

- 一般式 (I)、(II) 又は (III) で示される本発明の化合物は、その塩基の種類に応じて遺伝子の特定の塩基を認識し、これに結合することができ、さらに、化合物 (I)、(II) 又は (III) から製造され該化合物を構成成分として含有するオリゴ核酸は、そのような塩基を含む 1 本鎖核酸とハイブリダイズさせて 2 本鎖を形成する
- 20 ことができる。

ハイブリダイゼーションはストリンジエントな条件下で行われる。ストリンジエントな条件とは、例えば、塩 (ナトリウム) 濃度が 50~900mM であり、温度が 10~50 度 C、好ましくは塩 (ナトリウム) 濃度が 50~150mM であり、温度が 25 度 C での条件をいう。

- 25 本発明において、ニトロシル基転移反応を行う対象となる塩基は、特に限定されるものではなく、プリン塩基 (アデニン、グアニン) 及びピリミジン塩基 (シトシン、チミン) のどちらでもよい。例えば、下記の実施例に示すように、塩基構造として式 (I) に示すプリン塩基 (例えばグアニン) を用いた場合には、化

合物 (I) は対応するシトシン塩基を認識し、この塩基を含む核酸に対して特異的にニトロシル基転移反応を実現するのに有用である。なお、「対応する」とは、それぞれの塩基に対して相補的であることを意味する。従って、例えばグアニンに対応する塩基はシトシンとなる。

- 5      水素結合形成のための塩基が他のものでも同様であり、式 (II) 又は (III) におけるピリミジン塩基 (シトシン、チミン) を使用した場合は、対応する塩基 (それぞれ G、A) に対する反応も可能である。

反応は、図 1 に示す水素結合錯体内で実現される。さらに、N-ニトロソシトシンはウラシルに加水分解されることが報告されている (例えば R. Glazer, R. Sundeep, M. Lewis, M.-S. Son, S. Meyer, J. Amer. Chem. Soc., 121, 6108 (1999) など)。そこで、本発明においては、配列特異的にシチジンをデオキシウリジンに変換することができる (図 2)。すなわち、オリゴ核酸中のシトシンがウラシルに変異する。このときの変換反応は、酸性条件下で行われる。酸性条件は水溶液あるいは有機緩衝溶液などの反応溶液に、塩酸、酢酸、硫酸、リン酸などを加え pH 2 ~ 6、好ましくは 4 ~ 5 に調節する。さらに各種の有機酸などを用いて pH を調整することもできる。反応温度は 10 ~ 30℃、好ましくは 15 ~ 25℃であり、反応時間は 10 ~ 40 時間、好ましくは 20 ~ 30 時間である。

本発明の化合物は、配列特異的ニトロシル基転移反応により NO 活性種を特定の場所に運ぶ、いわゆるドラッグデリバリー用化合物として利用することが可能である。

## 5. 塩基配列の変異誘発剤又は変異誘発用キット

本発明の化合物又はオリゴ核酸は、塩基配列の変異誘発剤又は変異誘発用キットとして使用することができる。本発明の変異誘発剤又はキットは、本発明の化合物又はオリゴ核酸のうち少なくとも 1 つを含むものであり、全部を含めることもできる。「塩基配列」とは、DNA、cDNA、RNA、mRNA などの核酸の塩基配列を意味し、生物由来のものであると人工的に合成されたものであるとを問わない。鋳型となる核酸は、細菌、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、あるいは

哺乳動物などから公知手法により採取することができ、ゲノム、プラスミドなど、核酸を有するあらゆるものを使用することができる。

オリゴ核酸は、上記鋳型核酸の塩基配列のうち、変異を誘発させたい塩基の位置と同じ位置に本発明の化合物が位置するように、すなわち、鋳型となる塩基配列にハイブリダイズするように合成する。合成後は、目的の鋳型核酸とハイブリダイズさせ、前記のニトロシル転移反応を行い、前記の酸性条件下で処理すればよい。

本発明のキットには、本発明の化合物のほか、ハイブリダイゼーション溶液、洗浄用緩衝液、蛍光発色試薬などを含めることができる。

10

### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕 チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の合成

15 既知の方法 (M. Kadokura, T. Wada, K. Seio, and M. Sekine J. Org. Chem., 65, 5104-5113 (2000)) により合成した 2'-デオキシ-6-チオグアノシン (t-ブチルジメチルシリル誘導体) ( $0.25 \mu\text{mol}$ )、SNAP (2, S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン) ( $0.25 \mu\text{mol}$ )、トリエチルアミン ( $0.28 \mu\text{mol}$ ) のメタノール溶液 ( $500 \mu\text{l}$ ) を  $0^\circ\text{C}$  にて攪拌した。反応液を直接 HPLC-MS に注入し、ESI-MS を測定した(図 20 4)。HPLC 条件は以下の通りである。

カラム : Sym,etry C18 2x50 mm

カラム温度 :  $25^\circ\text{C}$

移動相 : A= $\text{H}_2\text{O}$ , B=MeOH, %B=60-100%/5min then 100% 20 min

流速 :  $0.2 \text{ mL/min}$

25 UV:254nm

HPLC 溶出液をスプリッターで分離し、約 1/40 (約  $5 \mu\text{L}$ ) を質量分析器に導入した。質量分析はポジティブモード ESI-TOF で行った。MS 条件 (Applied

biosystem Mariner System 5299)は、Spray Tip Potential, 4006, Nozzle potential 300, Nozzle temperature 140 により行った。

質量分析結果を以下に示す。

5  $t_R$  1.1 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 541.1705, calcd 541.2443 for 3 (C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>S<sub>1</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>),  $t_R$  7.8 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 701.4343, calcd 701.3001 for 4 (CHNSOSi),  $t_R$  15.0 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 1021.4972, calcd 1021.4854 for 5 (C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>4</sub>).

図 4 で示した時間経過の観察から、図 3 のスキーム 3 又は 4 に示す化合物が合成されていることが示された。

10

#### 〔実施例 2〕 オリゴ核酸の合成

既知の方法で合成した S-(2-シアノエチル)-2'-デオキシ-6-チオグアノシンの 5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)体を、DNA 合成装置 (型名: DNA/RNA Synthesizer、Applied Biosystems 社) によりオリゴヌクレオチドに導入した。その後、28%アンモニア水中、55℃で5時間加熱することによりオリゴヌクレオチド 6 (図 5 のスキーム 6 : 配列番号 1) を得た。オリゴヌクレオチド 6 (150 nmol) 及び SNAP (3 μmol) を炭酸塩緩衝液(pH 10.0) 300 μl に溶解し、室温で 12 時間放置した。HPLC で反応の進行を確認した後、同じ HPLC 条件で新しく生成したピークを単離した。  
20 その結果、図 5 のスキーム 7 に示すオリゴヌクレオチド 7 (配列番号 2) を得た。260nm での UV 吸光度により、収率は 31%であった。また、MALDI-TOF MASS による分子量測定を行った結果、理論値 4797.76 に対応する分子量 4796.69 の測定値を観測した。

#### 25 〔実施例 3〕 ヌクレオチド 7 の分解による[NO<sup>+</sup>] の発生試験

蛍光セル中にオリゴヌクレオチド 7 (図 5) の MES 緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl、pH5 および pH7 に調整、1.5 mL、オリゴヌクレオチド 7:0.5 μM) を入れ、この溶液に DAF-2 (diaminofluorescein、最終濃度 4 μM)を加え 25℃にて

攪拌した。この反応溶液の蛍光スペクトル（励起波長 488 nm, 蛍光波長 500-600 nm）を経時的に測定した。また、同時にこの溶液から経時的に 1  $\mu$ l をサンプリングし、HPLC に注入してオリゴヌクレオチド 7 からオリゴヌクレオチド 6 への変化を観測した。

5 カラム: Nacalai tesque, COSMOSIL 5C18-MS (4.6x250 mm);

移動相: A: 0.1M TEAA Buffer, B: CH<sub>3</sub>CN,

B: 10% to 30% /20 min, 40% /30 min, linear gradient;

Flow rate: 1.0 ml/min; UV-monitor: 260 nm.

512 nm における蛍光強度の相対値及びオリゴヌクレオチド 6 への変化率をグラフに表した(図 6)。pH5 ではオリゴヌクレオチド 7 からオリゴヌクレオチド 6 への変化と、同時に測定した DAF-2 の蛍光強度の増大曲線（図 7）とがよく一致する傾向を示した。

図 7 において、各グラフの記号の内容は以下の通りである。

●: pH5 における反応での DAF-2(diaminofluoresceine)の蛍光強度（相対的な NO 濃度を示す）。

★: pH7 における反応での DAF-2 の蛍光強度

■: pH5 における反応での 6 の相対濃度: チオグアノシン体の再生を示す。

▲: pH7 における反応での 6 の相対濃度

20 このことから、オリゴヌクレオチド 7 からオリゴヌクレオチド 6 への変化に伴い、[NO<sup>+</sup>]等価化学種がオリゴヌクレオチド 7 から溶液に放出されたことが示された。一方、pH7 の反応溶液ではオリゴヌクレオチド 7 からオリゴヌクレオチド 6 への変化は殆ど起こらず、また DAF-2 の蛍光強度にも殆ど変化がなかった（図 7）。これらの結果から、オリゴヌクレオチド 7 は安定な[NO<sup>+</sup>]等価化学種の前駆体となつてゐることが判明した。

〔実施例 4〕 オリゴヌクレオチド 7 とその相補的オリゴヌクレオチド 8 との反応

図 8 のオリゴヌクレオチド 7(ODN(7),)及びその相補鎖オリゴヌクレオチド 8(ODN(8))を用いて、2本鎖 DNA 内 NO-転移反応を行った。

反応は、ODN(7)及び ODN(8,10-12)の各 10  $\mu$ M、または 1mM グルタチオンを用いて、100mM NaCl を含む 50mM MES バッファー中 pH7、25℃で行った。

- 5 ODN(6) : 配列番号 1
- ODN(7) : 配列番号 2
- ODN(8) : 配列番号 3
- ODN(9) : 配列番号 4
- ODN(10) : 配列番号 5
- 10 ODN(11) : 配列番号 6
- ODN(12) : 配列番号 7

反応混合物は、HPLC により分析した。HPLC の条件を以下に示す。

ODS column, 1 mL/min

- 15 移動相: A: 0.1M TEAA Buffer, B: CH<sub>3</sub>CN, B: 10% to 30%/20 min, 40%/30 min
- linear gradient
- モニター : 260 nm

- 20 結果を図 9 及び 10 に示す。ODN(7)を、dC (シチジン) 又は d<sup>m</sup>C (5-メチルシチジン) を有する ODN(8)と反応させると、ODN(7)から 6 (配列番号 1) への急速な変換反応が起こった。これに対し、dT、dA 又は dG を有する ODN(8)との反応速度は、バックグラウンドレベルであった。従って、ODN(7)は、dC 及び d<sup>m</sup>C に対して高い選択性を有することが明確に示された。標的部位とは異なる部位に
- 25 dC を有する ODN(10-12)の場合は転移反応はなく、このことは ODN(7)の高い部位選択性を有することを示すものである。また、グルタチオンは生理的濃度条件下(1mM)では ODN(7)と反応しなかった。これらの結果は、ODN(7)の高い選択的反応性は、二重鎖 DNA 中の S-NO チオグアノシンと標的 dC 又は d<sup>m</sup>C との間に

おける十分な近接効果によるものであることを示している。

〔実施例 5〕 S-NO オリゴヌクレオチド 7 および NO 転移オリゴヌクレオチド 8 と DAF-2 との反応

- 5      オリゴヌクレオチド 7 とオリゴヌクレオチド 8(X=C)との反応溶液に NO 検出蛍光色素である DAF-2 を共存させて蛍光スペクトルの変化を追跡したところ、蛍光強度は殆ど変化しなかった。このことから、この反応でオリゴヌクレオチド 7 から放出された[NO<sup>+</sup>]等価化学種は溶液中に放出されていないことが確認された。NO が化合物 2 から 3 に転移することは、蛍光試薬 DAF-2 を用いて確認した
- 10    (図 1 1)。ODN(7)と DAF-2 とを混合して pH3、室温で 20 分インキュベートし、混合物を NaOH 溶液により pH10 まで上げてアルカリ化した後、HPLC を行った。NO 種の存在は DAF-2 のトリアゾール誘導体のピークを検出することにより明確に証明された。また、DAF-2 を、転移反応 8 時間目の反応混合物から単離した ODN(9) (X=dC 又は d<sup>m</sup>C) と混合し、上記と同様にして DAF-2 トリアゾール誘導体のピークを検出した。その結果、ODN(7)について得られた結果とほとんど同一の強度のピークが表れた。これらの結果は、NO が ODN(7)から ODN(8) (X=dC, d<sup>m</sup>C)に高効率で転移され、NO 転移 ODN(9)は、単離条件下では安定であることを明確に示している。
- 15

- 20      〔実施例 6〕 反応後の相補的オリゴヌクレオチド 9 (X=C) の酸処理および酵素加水分解

図 12 に示すように、オリゴヌクレオチド 7 とオリゴヌクレオチド 8 をそれぞれ約 20 μM 含む MES 緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl, pH7) を、25℃で 8 時間反応させた。その後、溶液を pH5 に調整し同じ温度でさらに 30 時間放置した。この反応混合物からオリゴヌクレオチド 9 を HPLC により単離し、凍結乾燥した。

25

HPLC 条件は以下の通りである。

カラム : Nacalai tesque, COSMOSIL 5C18-MS(4.6x250mm)

移動相：A=0.1M TEAA バッファー、B=CH<sub>3</sub>CN, 10% to 30%/ 20min, 40% /30 min, linear gradient

流速：1.0ml/min

UV モニター：260nm

- 5 単離したオリゴヌクレオチド 9 を酵素により加水分解し、生成するヌクレオシドを HPLC で分析した。酵素分解および HPLC 条件は以下の通りである。

酵素分解反応

BAP: bacteria alkaline phosphatase

VPDE: venom phosphodiesterase

- 10 緩衝液: 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 37 度 C pH 7.

HPLC 条件

カラム：Nacalai tesque, COSMOSIL 5C18-MS(4.6x250mm)

移動相：A=0.1M TEAA バッファー、B=CH<sub>3</sub>CN, 10% to 30%/ 20min, 40% /30

- 15 min, linear gradient

流速：1.0ml/min

UV モニター：260nm

- 20 酵素分解物の分析結果ではオリゴヌクレオチド 9 に含まれる C,G,A に加えて、2'-デオキシウリジンとシチジンジアゾエートがそれぞれ 8 % および 14 % で得られた (図 12)。従って、オリゴヌクレオチド 9 の 12 番目の塩基 C (3'末端から 5 番目) がオリゴヌクレオチド 8 の対応塩基(X=dU)と変化したこと (シトシンからウラシルへの変異) が示された。

- 25 [実施例 7] 反応後の相補的オリゴヌクレオチド 9 (X=5-メチル C) の酸処理および酵素加水分解

図 13 に示すように、オリゴヌクレオチド 7 とオリゴヌクレオチド 8 をそれぞれ約 20 μM 含む MES 緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl, pH7) を、25℃で 8 時間反応させた。その後、溶液を pH5 に調整し、CaCl<sub>2</sub> ZnCl<sub>2</sub>, あるいは MgCl<sub>2</sub> を



加え(5 mM)、同じ温度でさらに1日放置した。この反応混合物からオリゴヌクレオチド9をHPLCにより単離し、凍結乾燥した。これをBAP及びBPDEで加水分解した後、HPLCにかけた。酵素反応条件およびHPLC条件は以下の通りである。

## 5 酵素分解反応

BAP: bacteria alkaline phosphatase

VPDE: venom phosphodiesterase

緩衝液: 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 37度 C pH 7.

ODS column, 4.6×200mm,

10 移動相: A=50mM HCOONH<sub>4</sub>, B=CH<sub>3</sub>CN, 2 to 20%/50min, linear gradient

流速: 1.0ml/min

UV モニター: 254nm

対照実験は、ODN(1)及び標的 ODN(3)を用い、上記方法と同様にして行った。

15 結果を図13に示す。図13において、明らかにdTが生成していることが確認された。さらにアステリクス(\*)で記したピークは、既報(Suzuki, T. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 10, 1063-1067)の通り合成したd<sup>m</sup>C-ジアゾエートの保持時間と同じ時間を示す。注目すべきことに、d<sup>m</sup>CからdTへの転換比は42%であり、d<sup>m</sup>C-ジアゾエート(13%)とともに高い値が得られた(図13)。

20 dG又はdAの脱アミノ化産物の生成を示す大きなピークが無いことから、このNO-転移反応が高い塩基選択性を有することを示している。これらの結果からNOはdC及びd<sup>m</sup>Cのアミノ基に転移することが示された。また、DAF-2実験の項で記述したように、ODN(9)中のN-NO種は安定であるため、酵素反応によりdC又はd<sup>m</sup>Cが観測される理由は、現段階では、N-NO種が酵素加水分解反応の  
25 間にdC又はd<sup>m</sup>Cに戻るものと予想される。

上記のように、NO-転移及びそれに続く脱アミノ化の効率は、NOガス又は他のニトロシル化剤を用いた従来の方法と比較して極めて高い。従って、本発明は、DNA傷害におけるNOの役割を理解するために有用である。また、本発明の新

規 NO-送達方法を応用して、選択的に翻訳又は重合ステップでの部位特異的変異誘発を行うことが可能となる。

#### 産業上の利用可能性

- 5 本発明により、チオヌクレオシド・S-ニトロシル誘導体が提供される。本発明の誘導体は、そのニトロシル基を配列特異的かつ塩基特異的に転移させることができ、相補鎖の塩基を置換させることができるため、標的塩基の点変異誘発用ツールとして有用である。

#### 10 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成ヌクレオチド

配列番号 1 : n は a, g, c 又は t のチオヌクレオチド誘導体を表す (存在位置 : 5)

配列番号 2 : 合成ヌクレオチド

- 15 配列番号 2 : n は a, g, c 又は t のチオヌクレオチドニトロシル誘導体を表す (存在位置 : 5)

配列番号 3 : 合成ヌクレオチド

配列番号 3 : n は a, g, c 又は t を表す (存在位置 : 12)。

配列番号 4 : 合成ヌクレオチド

- 20 配列番号 4 : n は a, g, c 又は t のニトロシル誘導体を表す (存在位置 : 12)。

配列番号 5 : 合成ヌクレオチド

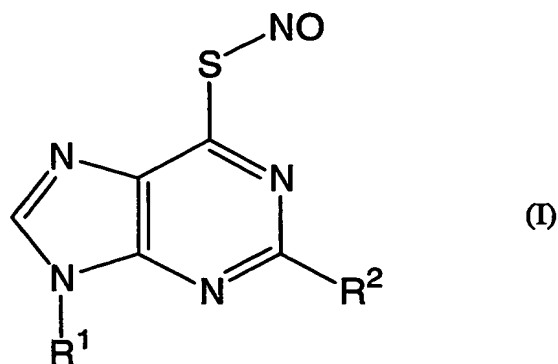
配列番号 6 : 合成ヌクレオチド

配列番号 7 : 合成ヌクレオチド

25

## 請求の範囲

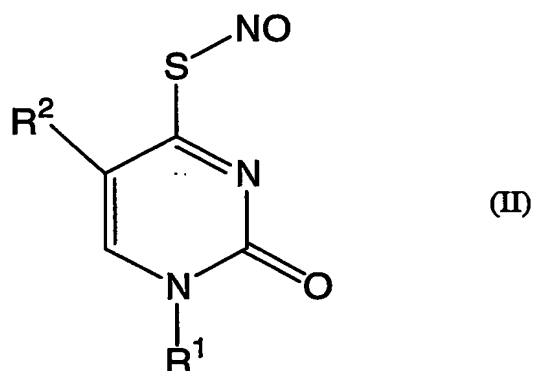
## 1. 次式 (I):



〔式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基（R³は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

10 で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

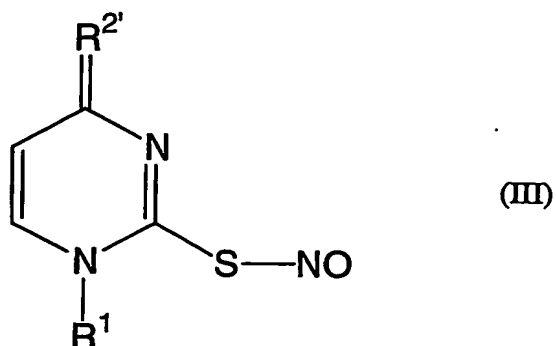
## 2. 次式 (II):



〔式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基（R³は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

15 で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

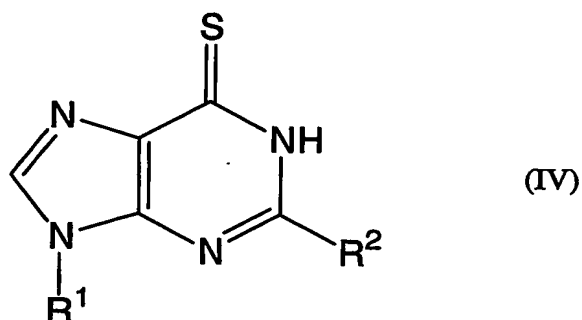
## 3. 次式 (III) :



(R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

5 示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

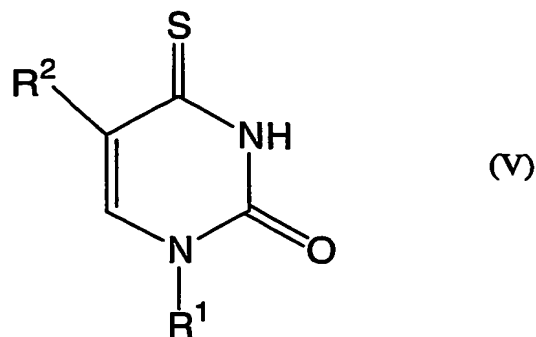
## 4. 次式 (IV) :



10 [式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基 (R³は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1~15のアシル基を表す。) を表す。]

示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

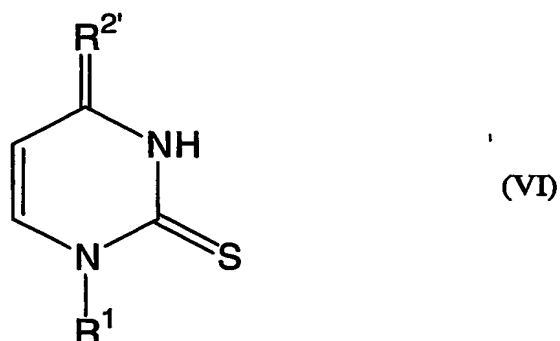
## 5. 次式 (V) :



〔式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基（ $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

6. 次式 (VI) :



10 (  $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^{2'}$ は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

7. 請求項1～3のいずれか1項に記載の誘導体又はその塩を含むオリゴ核酸。

15 8. 少なくとも12塩基の長さを有するものである請求項7記載のオリゴ核酸。

9. 請求項7又は8記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させることにより、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその相補鎖中の対応塩基に転移させることを特徴とするニトロシル基の転移方法。

- 1 0. 請求項 7 又は 8 記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させ、得られる反応産物を酸性条件下で処理することを特徴とする塩基配列の変異誘発方法。
- 1 1. 塩基配列が、オリゴ核酸中の誘導体に対応する塩基配列である請求項 1 0 記載の方法。
- 5 1 2. 変異がウラシルへの変異である請求項 10 又は 11 記載の方法。
- 1 3. 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の誘導体並びに請求項 7 及び 8 記載のオリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、塩基配列の変異誘発剤。
- 1 4. 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の誘導体並びに請求項 7 及び 8 記載の  
10 オリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、塩基配列の変異誘発用キット。

図 1

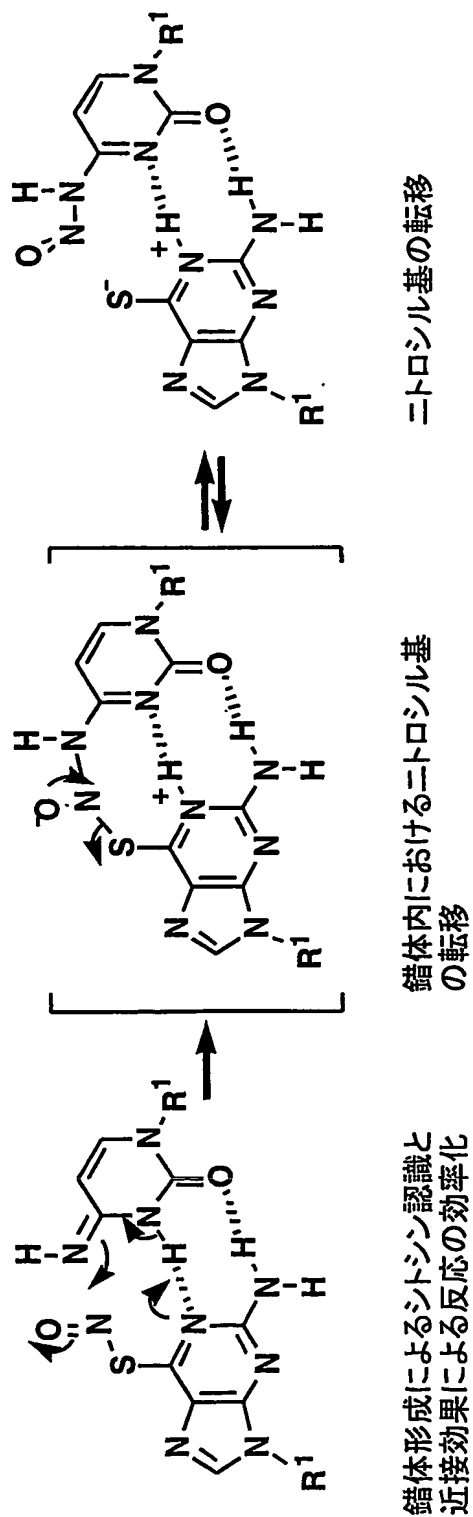
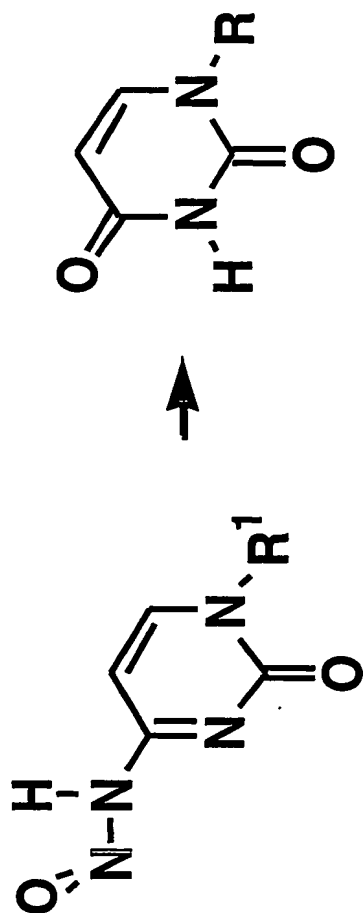


図 2



N-ニトロソ体のカルボニル基への加水分解



図 3

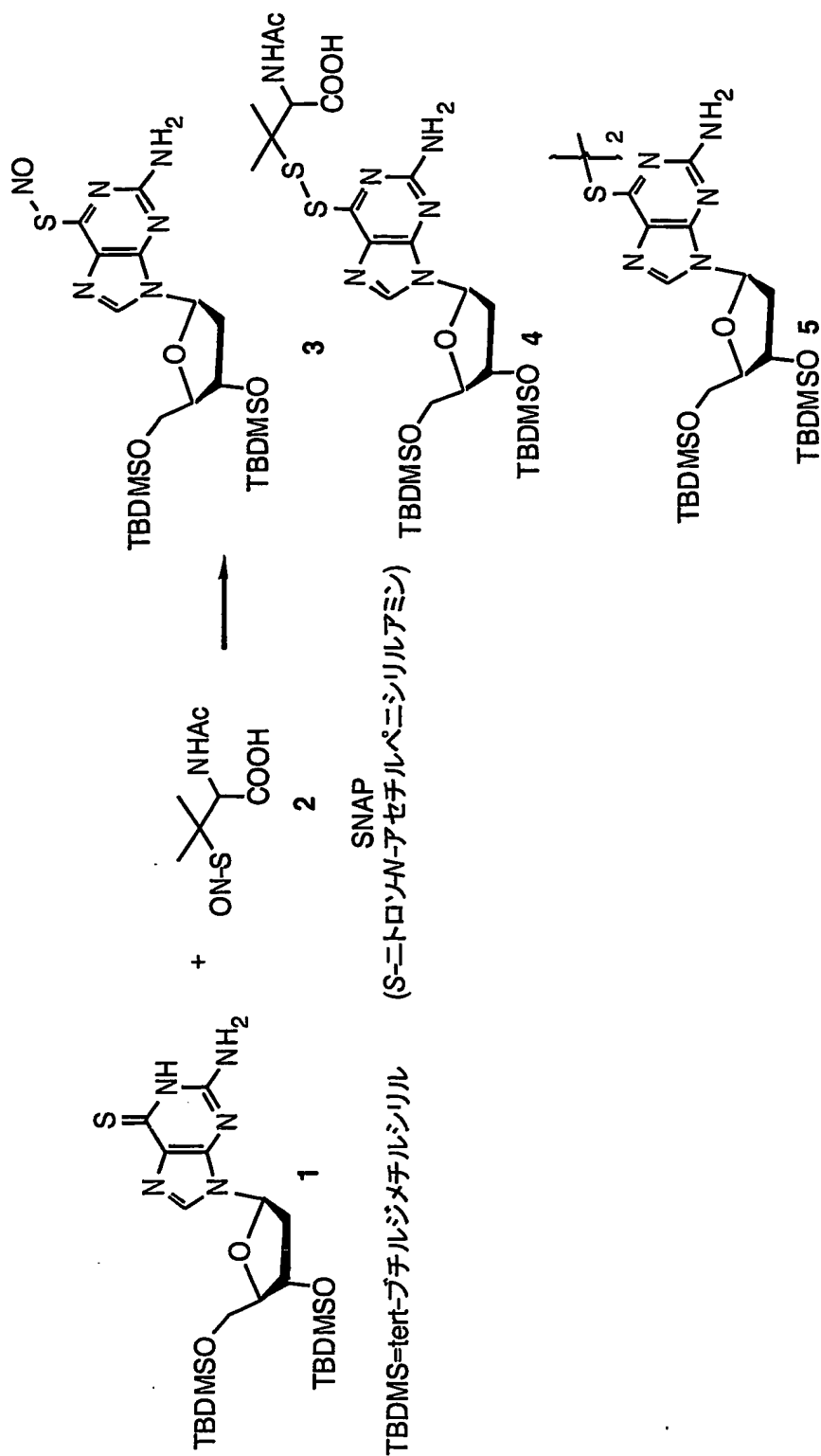


図 4

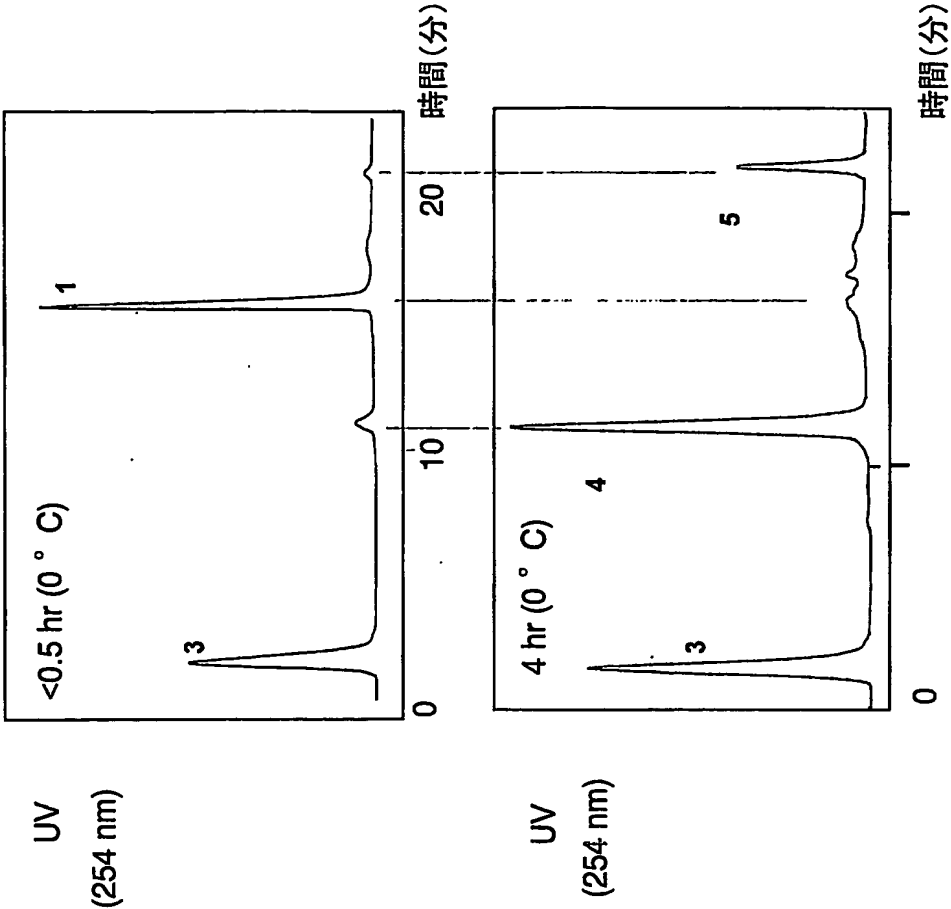


図 5

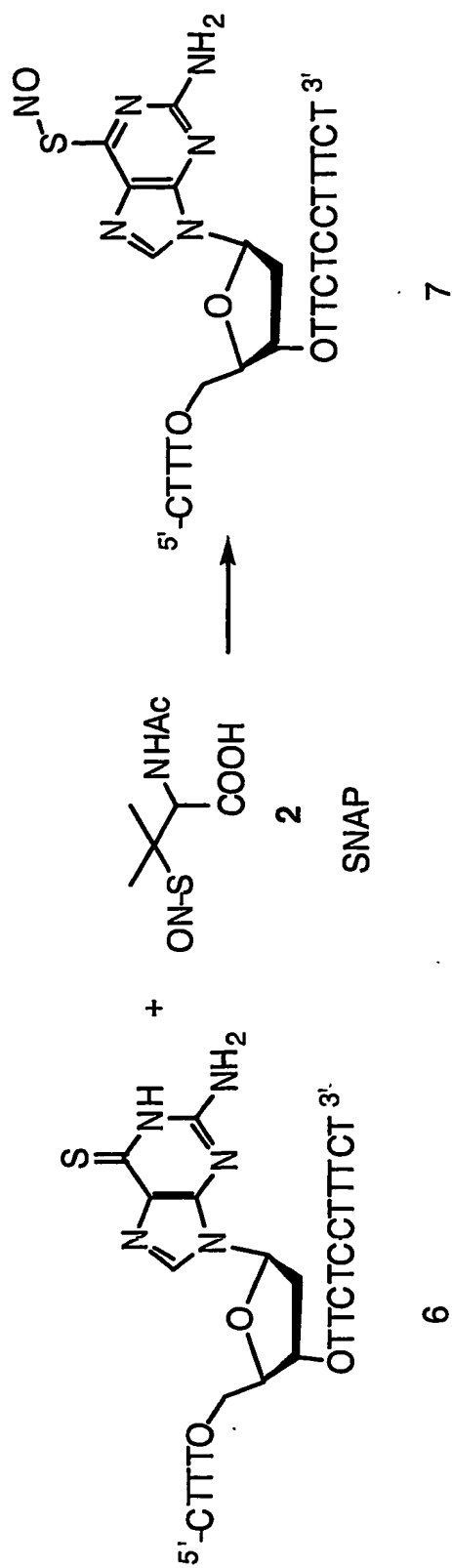


図 6

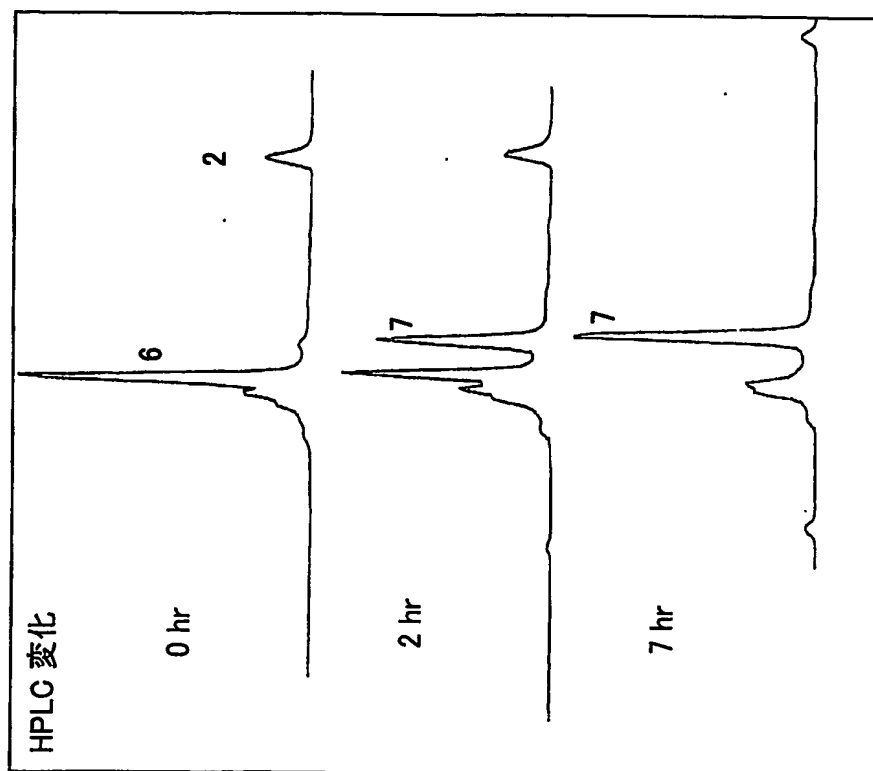


図 7

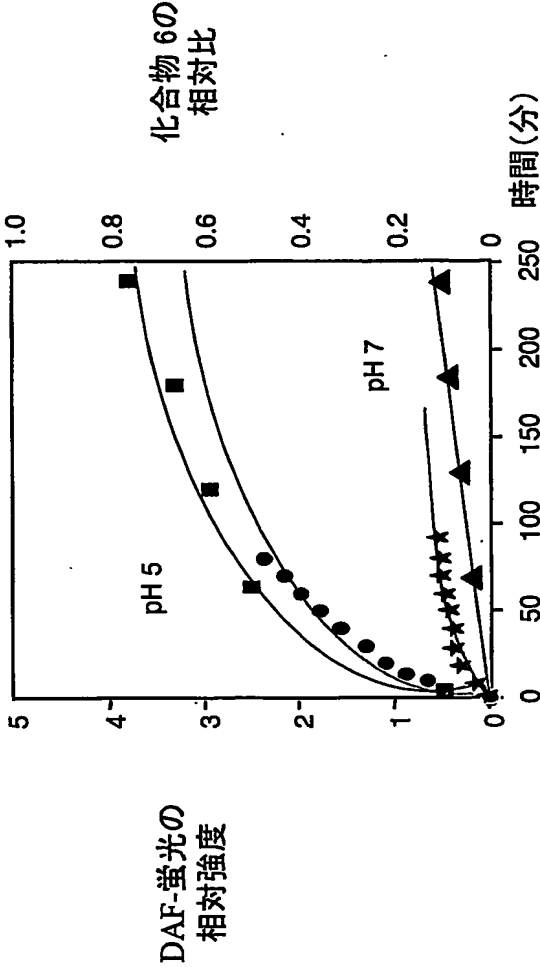
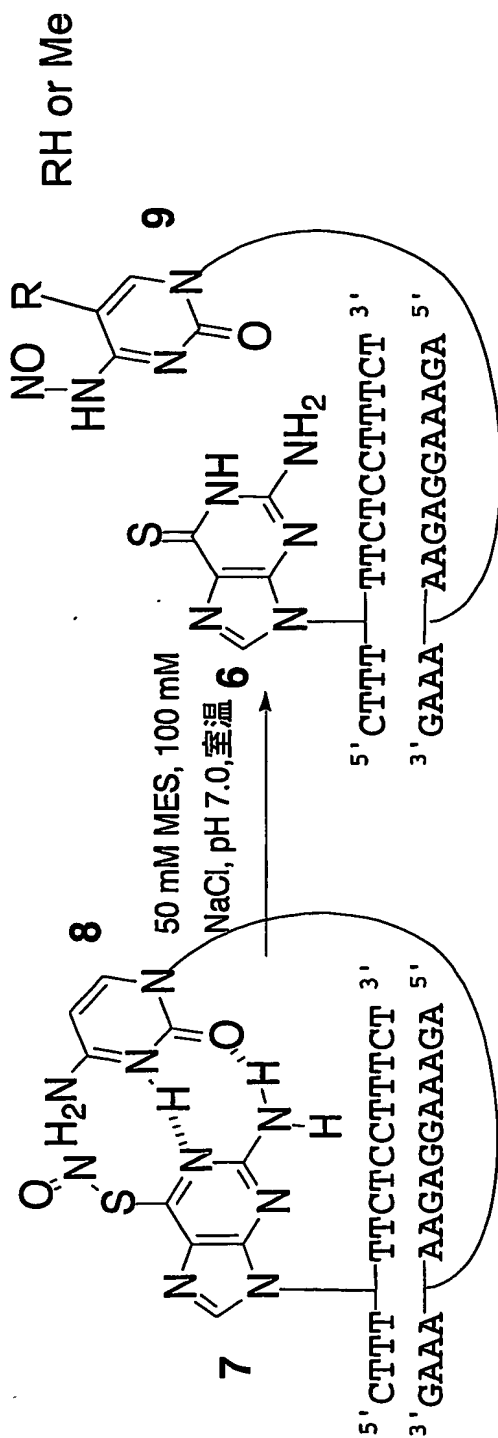


図 8



- 8:** 3' GAAA-X-AAGAGGAAAGA 5'
- 10:** 3' GAAA-T-CAGAGGAAAGA 5'
- 11:** 3' GAAA-T-A-CGAGGAAAGA 5'
- 12:** 3' GAAA-T-AA-CAGGAAAGA 5'
- 13:** Glutathione

X=C, <sup>m</sup>C, T, A, G  
(<sup>m</sup>C=5-メチルシチジン)

図 9

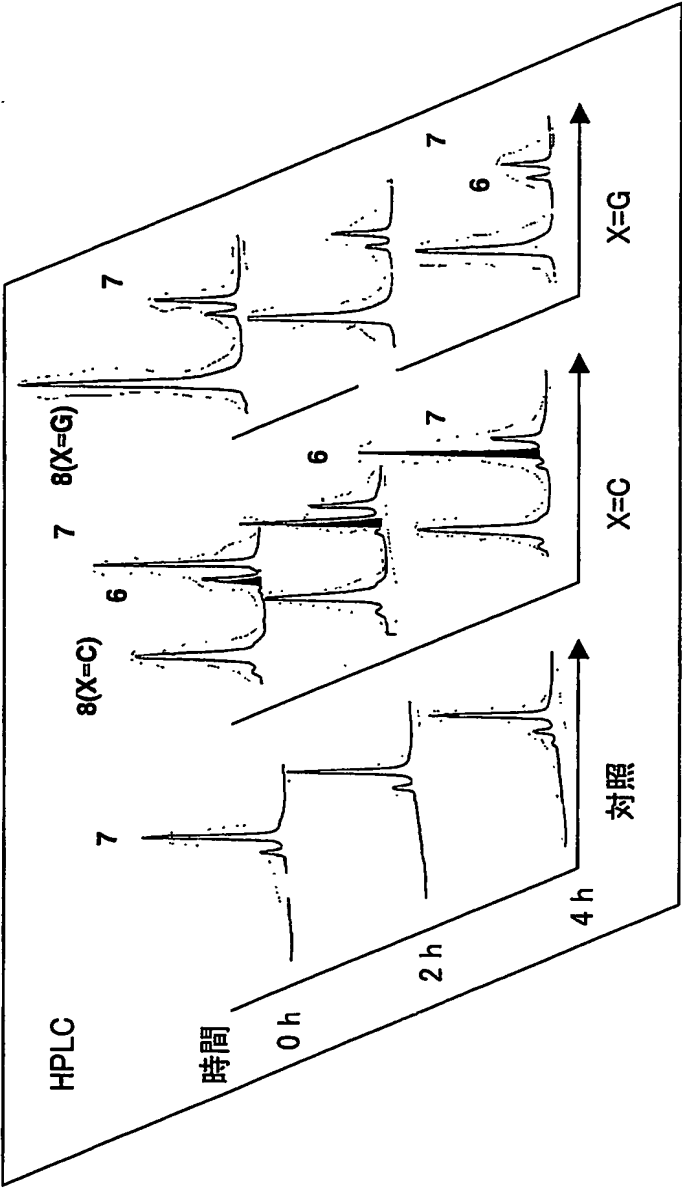


図 10

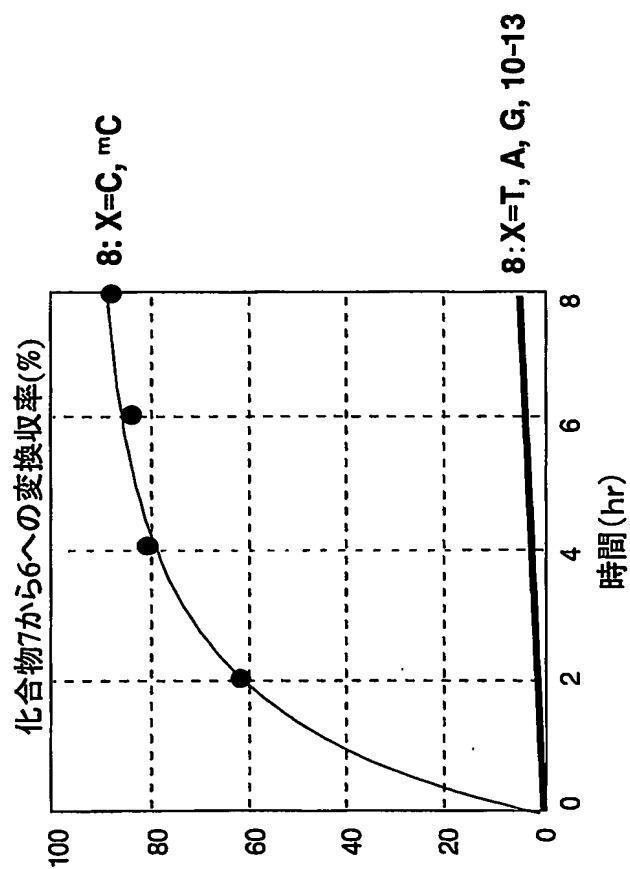
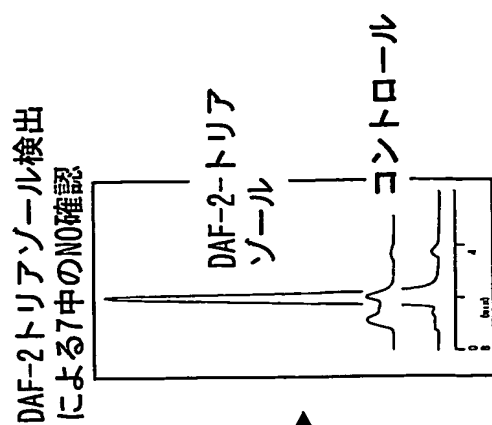


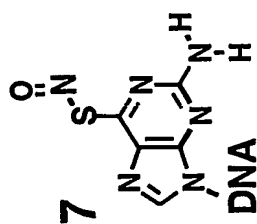


図 11

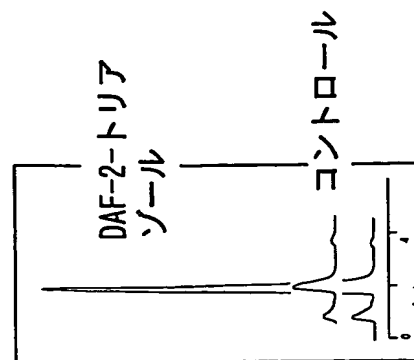


- 1) DAF-2 と7を室温、  
pH 3で20分反応
- 2) NaOH でpHを10に調節

DAF-2: 10  $\mu$ M  
DNA(1): 7  $\mu$ M  
DNA(4): 8  $\mu$ M



DAF-2トリアゾールによる  
9中のNO確認



- 1) HPLCによる9の単離
- 2) 凍結乾燥
- 3) DAF-2 と9を室温、  
pH 3で20分反応
- 4) NaOH でpHを10に調節

DAF-2: 10  $\mu$ M  
DNA(1): 7  $\mu$ M  
DNA(4): 8  $\mu$ M

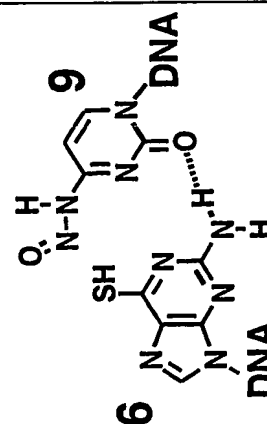
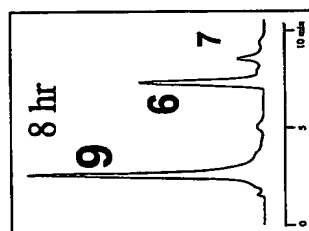


図 12

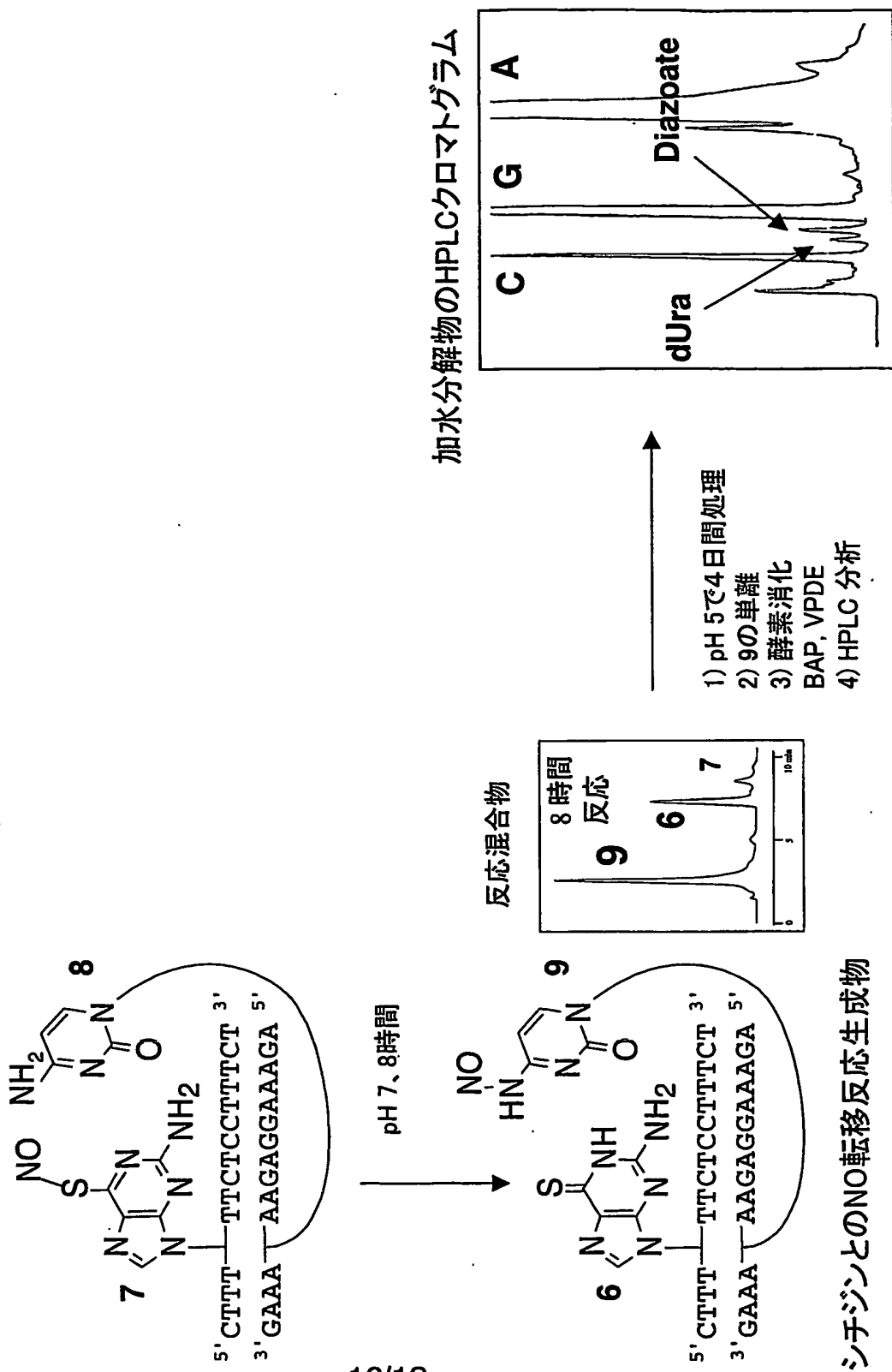
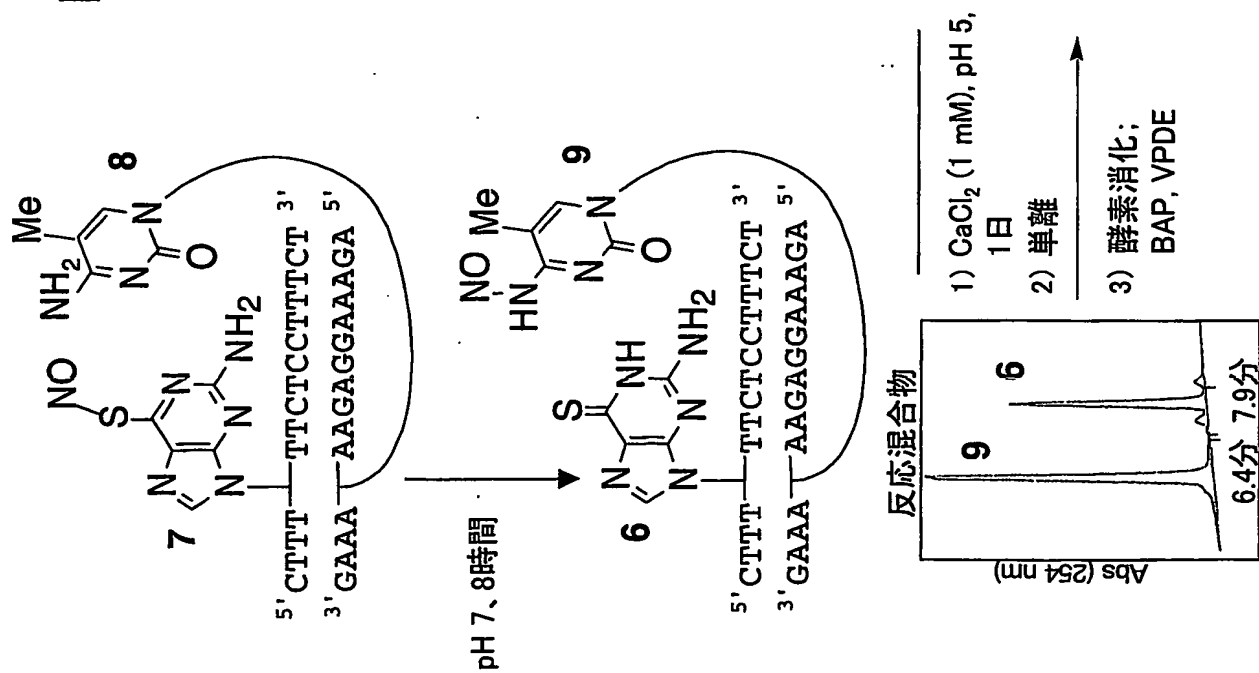


図 13



5-メチルシチジンとのNO転移反応生成物

\*印は5-メチルシチジンジアゾエート体

SEQUENCE LISTING

<110> KYUSHU TLO COMPANY, LIMITED

<120> Thionucleoside-S-nitrosyl derivatives

<130> P03-0049PCT

<150> JP2003-117569

<151> 2003-04-22

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 5

<223> n represents thionucleotide derivative of a, g, c or t

<400> 1

ctttntttctc ctttct

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 5

<223> n represents thionucleotide nitrosyl derivative of  
a, g, c or t

<400> 2

ctttntttctc ctttct

16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents a, g, c or t

<400> 3

agaaaggaga anaaag

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents nitrosyl derivative of a, g, c or t

<400> 4

agaaaggaga anaaag

16

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<400> 5

agaaaggaga ctaaag

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<400> 6

agaaaggagc ataaag

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<400> 7

agaaaggaca ataaag

16



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003337

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/073, 21/04, C12N15/19, 15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07H19/16-19/207, 19/06-19/10, 21/00-21/04, C12N15/19, 15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS); JST7580 (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AMADO, Severio et al., Kinetics and mechanism of the formation and reactions of S-nitroso derivatives of some heterocyclic thiones, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001, No.4, pages 441 to 447	1-14
A	JP 2000-506492 A (Amersham Pharmacia Biotech UK. Ltd.), 30 May, 2000 (30.05.00), & WO 97/11083 A1 & EP 866796 A1 & US 6153745 A & AU 9669963 A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 May, 2004 (11.05.04)

Date of mailing of the international search report  
25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003337

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/073, 21/04, C12N15/19, 15/11

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H19/16-19/207, 19/06-19/10, 21/00-21/04, C12N15/19, 15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS), JST7580 (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	AMADO, Severino et al., Kinetics and mechanism of the formation and reactions of S-nitroso derivatives of some heterocyclic thiones, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001, No.4, p.441-447	1-14
A	JP 2000-506492 A (アマシャム・ファーマシア・バイオテック・ユー・ケイ・リミテッド*) 2000.05.30 & WO 97/11083 A1 & EP 866796 A1 & US 6153745 A & AU 9669963 A	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.05.2004

国際調査報告の発送日

25.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：